

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Brodifakum sebagai Derivat Coumarin

Coumarin atau 1,2-benzopyrone merupakan zat kimia yang sering ditemukan dalam bermacam-macam tanaman. Senyawa coumarin telah menunjukkan spectrum yang luas dari tumbuhan obat yang digunakan sejak dahulu dan hingga saat ini sudah ditemukan sekitar 1300 senyawa lain yang berhasil diidentifikasi.^[5] 1,2-benzopyrone merupakan suatu kelas yang penting dan besar yang dibentuk oleh oxygen heterocycles. Banyak coumarin yang teroksigenasi pada posisi C-7, yang membuatnya menjadi 7-hydroxycoumarin, atau lebih sering dikenal dengan nama umbelliferone, yang sering dianggap sebagai prekursor biogenetik dari coumarin yang lebih kompleks.

Penelitian struktur kimiawi dari senyawa coumarin menunjukkan bahwa dalam beberapa coumarin, substitusi senyawa dapat terjadi di banyak tempat. Terdapat banyak kemungkinan permutasi yang ditawarkan dengan menggunakan substitusi dan konjugasi. Karenan efek farmakologi yang bermacam-macam, coumarin telah menarik peningkatan minat penelitian dalam beberapa tahun terakhir. Akan tetapi penjelasan tentang hubungan struktur dan aktivitas coumarin tetaplah belum jelas.^[6]

Coumarin memiliki tingkat toksik moderate untuk hepar dan ginjal, yaitu LD₅₀ 275mg/kg, tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan dengan senyawa yang memiliki hubungan dengan coumarin lainnya. Meskipun coumarin agak berbahaya bagi manusia, coumarin bersifat hepatotoksik pada tikus namun tidak pada mencit. Hewan jenis rodensia pada umumnya memetabolisme coumarin menjadi 3,4-coumarin epoxide, sanyawa yang beracun dan tidak stabil yang pada metabolisme lebih lanjut dapat menyebabkan kanker hepar pada tikus dan tumor traktus respiratorius pada mencit^[7]. Manusia pada umumnya memetabolisasi coumarin menjadi 7-hydroxycoumarin, senyawa dengan tingkat toksisitas yang lebih rendah. The German Federal Institute for Risk Assessment telah mengeluarkan jumlah konsumsi harian yang boleh dikonsumsi, yaitu 0,1 mg/kgBB, namun untuk konsumsi

yang agak tinggi dalam waktu singkat tidaklah terlalu berbahaya^[8]. Occupational Safety and Health Administration dari amerika serikat tidak mengklasifikasikan coumarin sebagai zat karsinogen terhadap manusia.^[9]

Meskipun sebenarnya coumarin tidak memiliki efek antikoagulan, coumarin dapat berubah menjadi natural antikoagulan dicoumarol oleh spesies beberapa fungi. Ini terjadi karena produksi dari 4-hydroxycoumarin, yang kemudian karena pada kehadiran formaldehid berubah menjadi anticoagulan yang sebenarnya yaitu dicoumarol. Dicoumarol pernah bertanggung jawab terhadap kasus pendarahan yang dikenal dengan nama "*Sweet clover disease*".^[10]

Berikut adalah beberapa contoh senyawa derivat dari coumarin :

- Brodifakum
- Bromadiolon
- Coumafury
- Difenacoum
- Warfarin

2.2 Brodifakum

2.2.1 Fisik dan kimia brodifakum

Antikoagulan sintesis ini pertama kali diperkenalkan pada tahun 1975 oleh karena banyaknya muncul hama tikus yang resistan terhadap golongan warfarin. brodifakum ini diperoleh dari kondensasi 4-hydroxycoumarin dengan 3-(4'-bromodiphenyl - 4-yl) - 1,2,3,4-tetrahydronaphtol.^[11]

Brodifakum adalah antikoagulan 4-hydroxycoumarin dengan kerja yang serupa dengan pendahulunya seperti dikoumarol dan warfarin. Tetapi karena potensi kerja yang tinggi dan durasi kerja yang panjang (waktu paruh 20 – 130 hari), brodifakum dikategorikan sebagai antikoagulan generasi kedua atau superwarfarin.

Brodifakum biasanya berbentuk bubuk putih yang tidak berbau dan mencair pada suhu 228 – 232 C. Brodifakum sangat rendah kelarutannya di air tetapi sangat larut apabila dicampur dengan acetone, kloroform dan larutan klorin lainnya. Brodifakum juga akan membentuk garam amine apabila terlarut dalam air. Brodifakum juga merupakan zat kimia yang stabil dan tidak gampang berubah ikatannya dalam suhu ruangan.^[1]

2.2.2 Absorpsi obat

Reaksi pemberian obat tergantung oleh dua faktor penting yaitu farmakokinetik dan farmakodinamik. Farmakokinetik adalah proses pergerakan obat untuk mencapai kerja obat dan aspek farmakologi yang mencakup efek obat dalam tubuh yaitu absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi.^[31]

1. Fase absorpsi: Saat pertama kali obat masuk dalam tubuh, obat diabsorpsi oleh jaringan tubuh. Faktor absorpsi inilah yang nantinya akan mempengaruhi jumlah dosis obat yang dibutuhkan dan kecepatan perjalanan obat di dalam tubuh.
2. Fase distribusi: Fase penyebaran obat di dalam jaringan – jaringan tubuh. Setelah diabsorpsi, obat terbagi menjadi dua bagian yaitu obat terikat dan obat bebas. Obat terikat mengalami fase distribusi ke sirkulasi sistemik menuju ke reseptor dan jaringan – jaringan. Sedangkan obat bebas melanjutkan proses ke fase metabolisme atau biotransformasi di hepar.
3. Fase biotransformasi: fase dimana terjadi perubahan struktur kimia obat dalam cairan atau jaringan tubuh dan dikatalis oleh enzim.
4. Fase ekskresi: merupakan fase pengeluaran sisa – sisa obat. Hasil metabolisme diekskresikan melalui ginjal. Kecepatan ekskresi dipengaruhi kecepatan eliminasi efek obat dalam tubuh.

Farmakodinamik adalah suatu pengaruh obat dalam tubuh. Mengenai efek fisiologis dan biokimiawi obat terhadap berbagai jaringan tubuh yang sakit maupun sehat serta mekanisme kerjanya.

2.2.3 Cara Kerja Brodifakum

Brodifakum, seperti racun antikoagulan lainnya, bekerja dengan mengganggu sintesis normal faktor pembekuan vitamin k-dependent pada hepar hewan vertebrata. Pada sel hepar vitamin k 1-2,3 epokside yang secara biologis tidak aktif di reduksi oleh enzim mikrosomal menjadi bentuk aktif vitamin K, yang sangat penting pada sintesis prothrombin dan faktor pembekuan lainnya. Brodifakum meng antagonisasi enzim vitamin K1-epoxide reductase pada hepar dan menyebabkan penurunan secara bertahap dari bentuk aktif vitamin K, dan pada akhirnya faktor pembekuan vitamin K-dependent, yang menyebabkan peningkatan waktu untuk pembekuan darah sampai pada titik dimana tidak terjadi pembekuan darah sama sekali.

Selain itu, Brodifakum (sama seperti antikoagulan yang lain dalam dosis toksik) meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, sehingga plasma darah dan darah mulai keluar dari pembuluh darah kecil. Hewan yang keracunan akan mengtalami pendarahan internal yang semakin lama semakin parah dan dapat mengakibatkan shock, kehilangan kesadaran dan pada akhirnya kematian.^[12]

Periode laten brodifakum mulai dari waktu pemberian hingga ditemukannya tanda-tanda klinis bermacam-macam. Pada tikus umumnya kematian terjadai dalam waktu 1 minggu setelah pemberian brodifakum. Kematian dapat juga terjadi secara tiba-tiba tergantung dimana pendarahan tersebut terjadi, terutama apabila pendarahan terjadi pada bagian otak maupun pada bagian jantung.

2.2.4 Metabolisme brodifakum

2.2.4.1 Absorpsi dan distribusi Brodifakum

Cara masuk brodifakum ke dalam tubuh dapat melalui per oral, inhalasi, maupun per kutan. Intoksikasi paling cepat melalui inhalasi, sedangkan paling lambat melalui per kutan. Absorpsi utama brodifakum terjadi di saluran gastrointestinal. Brodifakum dan senyawa terkait lainnya mengikat lebih kuat pada bagian lipofilik hepar daripada senyawa warfarin. Pada kasus intoksikasi tikus, konsentrasi substansi pada hepar adalah 20 kali lebih tinggi dibandingkan pada konsentrasi serum.^[13]

2.2.4.2 Biologi paruh waktu brodifakum

Seperti pada semua golongan superwarfarin, brodifakum memiliki waktu paruh pada plasma yang sangat panjang. Studi metabolisme pada hewan telah menunjukkan waktu paruh brodifakum sekitar 24 hari, 120 hari pada anjing, dan 156 jam pada tikus.^[11,14]

Warfarin memiliki waktu paruh pada plasma 42 jam dan dengan asumsi fungsi hepar normal. Sedangkan efek antikoagulan akan menghilang dalam beberapa hari. Sebaliknya, efek antikoagulan pada brodifakum dapat berlangsung selama lebih dari 7 minggu pada intoksikasi pasien.^[15]

2.2.4.3 Metabolisme brodifakum

Metabolisme brodifakum belum sepenuhnya didefinisikan akibat belum adanya penelitian ilmiah terhadap brodifakum. Tetapi mengingat brodifakum telah tersubstitusi dengan struktur 4-hydroxycoumarin, kemungkinan besar golongan superwarfarin ini dimetabolisme dengan cara yang mirip dengan warfarin. Brodifakum dihidroksilasi menjadi senyawa inaktif dengan campuran enzim oksidase di mikrosom hepar.^[15]

Phenobarbital diketahui dapat meningkatkan aktivitas sistem enzim mikrosomal hepatoseluler dan juga meningkatkan metabolisme brodifakum sama halnya dengan warfarin. Dalam penelitian pada hewan telah menunjukkan bahwa pretreatment dengan Phenobarbital dapat mengurangi efek antikoagulan dari brodifakum.^[13]

2.2.4.4 Eliminasi Brodifakum

Eliminasi brodifakum mungkin hampir mirip dengan senyawa warfarin yaitu dengan cara senyawa yang dihasilkan dari hidroksilasi pada fungsi sistem oksidasi hepatoseluler akan diekskresikan dalam urin.^[15]

2.2.5 Efek brodifakum pada organ

Brodifakum dapat mengakibatkan berbagai komplikasi pada organ tubuh hewan maupun manusia, diantaranya adalah^[1]

2.2.5.1 Neurologi

Dampak brodifakum pada system saraf dapat ditemukan pada sistem saraf pusat.ditemukan adanya perdarahan pada intracerebral akibat komplikasi sekunder.Pada beberapa kasus ditemukan juga terdapat perdarahan pada jaringan – jaringan otot terutama pada otot siku, lutut dan juga pantat. Sedangkan sistem syaraf tepi jarang ditemukan adanya komplikasi akibat brodifakum.^[1]

2.2.5.2 Gastrointestinal

Pada hewan yang diberikan brodifakum secara oral ditemukan adanya hematemesis dan juga melena pada saluran pencernaannya. Sedangkan pada kasus brodifakum yang tertelan oleh manusia biasanya didapatkan nyeri perut dan juga nyeri pinggang setelah terjadi perdarahan intra – abdominal.^[15]

2.2.5.3 Hepar

Pada penelitian yang sudah ada, walaupun hepar merupakan organ yang berperan dalam metabolisme brodifakum, tidak ditemukan gejala klinis yang jelas. Tetapi di hepar didapatkan adanya koagulopati dan juga terdapat residu brodifakum akibat dari metabolismenya.

2.2.5.4 Sistem saluran kemih

Haematuria biasanya didapatkan pada hewan yang terpapar brodifakum, haematuria bisa didapatkan secara klinis tetapi ada juga yang harus diperiksa dalam laboratorium. Brodifakum juga dapat menyebabkan perdarahan saluran kemih.^[15]

2.2.5.5 Kulit

Kadang – kadang pada beberapa kasus intoksikasi brodifakum pada manusia didapatkan juga munculnya ruam – ruam petekiae.^[1]

2.2.5.6 Mata, telinga, hidung, tenggorokan (efek local)

Didapatkan adanya epistaksis dan juga perdarahan pada bagian gusi akibat adanya gangguan koagulasi darah.

2.2.5.7 Hematologi

Komplikasi utama pada brodifakum dapat ditemukan pada hematologi karena brodifakum mengganggu sintesis vitamin K yang mengakibatkan adanya gangguan koagulasi darah. Koagulasi darah ini dapat ditemukan setelah terpapar brodifakum dalam dosis yang signifikan. Gejala hematologis yang biasa ditemukan adalah gusi berdarah, epistaksis, ekimosis, hematoma, hematuria, dan juga dapat ditemukan adanya perdarahan internal.^[1]

2.2.5.8 Resiko lain

Salah satu kasus aborsi telah dilaporkan oleh Lipton & Klaas (1984). Data sekresi ASI sampai saat ini belum ditemukan sehingga menyusui tidak dianjurkan. Individu dengan perdarahan diathesis memiliki resiko yang lebih tinggi.^[11]

2.2.6 Intoksikasi brodifakum

Brodifacoum menghambat enzim vitamin K epoksida reduktase. Enzim ini diperlukan untuk pembentukan dari vitamin K dari vitamin K-epoksida, dan brodifacoum terus menurunkan tingkat aktif vitamin K dalam darah.^[2] Vitamin K dibutuhkan untuk sintesis substansi – substansi penting seperti protrombin, yang terlibat dalam pembekuan darah. Gangguan ini menjadi bertambah parah sampai darah kehilangan kemampuannya untuk membeku secara efektif.^[16]

Sebagai tambahan, brodifakum (sama seperti antikoagulan lain dalam dosis toksik) meningkatkan permeabilitas kapiler darah; plasma darah dan darah itu sendiri mulai bocor ke pembuluh – pembuluh darah yang lebih kecil.

Binatang yang teracuni brodifakum dapat menderita perdarahan organ dalam yang semakin parah, mengakibatkan shock, kehilangan kesadaran, dan kematian.

Brodifakum sangat mematikan bagi mamalia dan burung, dan lebih parah pada ikan. brodifakum adalah racun yang mudah terakumulasi karena merupakan lipofilik dan sangat lambat dieliminasi oleh tubuh.^[17]

Nilai LD50 pada beberapa contoh binatang ^[16]

Tikus	0,27 mg/kgBB
Mencit	0,40 mg/kgBB
Kelinci	0,30 mg/kgBB
Marmut	0,28 mg/kgBB
Tupai	0,13 mg/kgBB
Kucing	0,25-25 mg/kgBB
Anjing	0,25-3,6 mg/kgBB

2.3 Tikus galur wistar

Tikus galur wistar adalah mamalia kecil yang masuk dalam orda Rodentia. Tikus galur wistar ini adalah tikus yang paling sering digunakan dalam penelitian biomedical.

Kingdom – animalia

Filum –Chordata

Class – Mamalia

Ordo – Rodentia

Famili – Muridae

Tikus ini biasanya memiliki berat badan 25 – 40g (betina) dan 20 – 40g (jantan). Umur rata – rata seekor tikus galur wistar adalah 1.5 – 3 tahun. Tikus juga memiliki sistem gastrointestinal yang hampir sama dengan hewan lain, tetapi memiliki perbedaan yang vital. Seperti esofagus yang masuk ke lambung pada bagian sentral. Panjang dari usus halus berbeda – beda pada tikus. Caecum pada tikus sangat luas dan tidak terbentuk umbai cacing (apendiks).^[18]

2.3.1 Anatomi gaster tikus galur wistar

Gaster adalah organ pencernaan yang paling melebar dan terletak di antara bagian akhir dari esophagus dan awal dari duodenum. Gaster berada di bawah difragma

dan terletak di region abdomen. Gaster terdiri dari beberapa bagian seperti kardiak, fundus, dan pilorus. Pada sebagian besar hewan, epitel squamous bertingkat berubah menjadi epitel kolumnar pada gaster. Kardiak merupakan bagian sempit pada pertemuan antara gaster dengan esofagus. Kardiak terdiri dari kelenjar kistik atau tubuler yang dilapisi sel-sel yang mensekresi mukus dimana diantaranya tersebar banyak sel-sel endokrin dan sedikit sel parietal serta sel utama (pepsinogen). Fundus merupakan bagian yang sedikit lebih kompleks dari kardiak, dimana pada bagian ini terdapat beberapa tipe sel seperti sel parietal yang menghasilkan asam klorida, sel chief, dan sel enteroendokrin.^[19]

Bagian pilorus lebih bercabang-cabang, berkelok-elok, dan lebih longgar dibanding bagian fundus. Kelenjar dilapisi oleh sel-sel yang mensekresi mukus dengan sitoplasma granuler dan nukleus basal, bersama dengan sel endokrin dan sel parietal yang tersebar. Sel endokrin pada antrum memproduksi berbagai hormon seperti gastrin, somatostatin, dan lainnya.^[20]

Struktur dari lambung tikus adalah dua bagian dan dipisahkan oleh prominent limiting ridge yang menghalangi untuk muntah. Makanan masuk ke lambung menuju lambung bagian depan (forestomach), sebuah daerah nonsekretori dengan epitel yang kasar. Bagian lambung yang dekat dengan duodenum adalah bagian glandular dan dikarakterisasi oleh epitel sekretori yang lembut dan lipatan-lipatan (rugae). Lambung tikus berada di rongga perut sebelah kiri, dekat dengan hati. Lambung tikus tidak jauh berbeda dengan lambung rodensia pada umumnya. Lambung bagian non glandular mempunyai lekukan mukus yang dilapisi dengan epitel skuamous berlapis. Bagian glandular adalah korpus yang dilapisi oleh epitel kolumnar sederhana. Kelenjar gastrik tersusun dari sel parietal dan sel chief. Bagian pilorus dari lambung dikarakterisasi oleh mukus dari epitel kolumnar sederhana.^[21,22]

Sebagian besar lambung mamalia menghasilkan pepsinogen A, pepsinogen C, cathepsin D, dan cathepsin E. Pada tikus hanya dihasilkan pepsinogen C dan cathepsin D serta E. Sel mast di lambung berbeda secara morfologi, histologi, dan farmakologi dari sel mast pada bagian tubuh lainnya. Histamin, diketahui berperan dalam kontraktilitas usus.^[21]

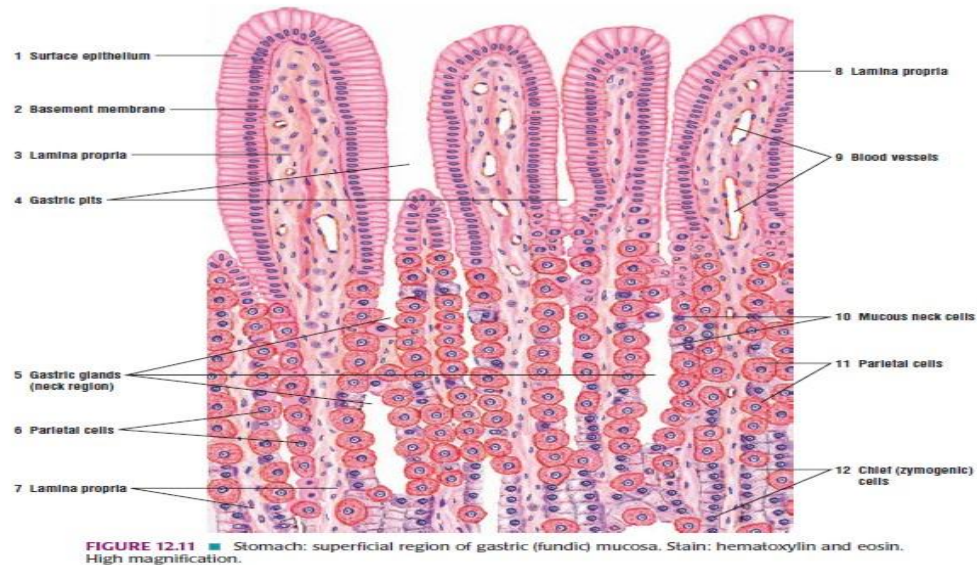
2.3.2 Histofisiologi gaster secara luas

Lambung adalah reservoir untuk menampung makanan dan pengolahannya oleh produk kelenjar – kelenjar dalam mukosa. Kapasitasnya cukup besar. Bila kosong, volume lumennya hanya 50 – 75 ml, namun 1,2 liter dapat masuk sebelum tekanan intraluminal mulai naik. volume secret yang dihasilkan seharusnya berkisar antara 500 – 1000 ml. Salah satu sifat luar biasa dari mukosa lambung adalah kemampuannya menghasilkan secret dengan pH mulai dari 2 sampai serendah 0,9.

Lambung merupakan organ gabungan eksokrin dan endokrin yang mencernakan makanan dan mensekresikan hormone. Mukosa lambung dilapisi oleh epitel kolumnar simpleks dan terdapat sel goblet. Dinding gaster terdiri atas empat lapisan umum saluran cerna yaitu mukosa, submukosa, muskularis eksterna, dan serosa^[23]

Mukosa melapisi permukaan luminal saluran pencernaan. Bagian ini dibagi menjadi tiga lapisan, komponen utama mukosa adalah membrane mukosa, suatu lapisan epitel bagian dalam yang berfungsi sebagai permukaan protektif serta mengalami modifikasi di daerah – daerah tertentu untuk sekresi dan absorpsi. Membran mukosa mengandung sel eksokrin untuk sekresi getah pencernaan, sel endokrin untuk sekresi hormon saluran pencernaan, dan epitel yang khusus untuk penyerapan nutrisi^[24].

Lamina propia adalah lapisan tengah jaringan ikat yang tipis tempat epitel melekat. Pembuluh – pembuluh darah halus, pembuluh limfe, dan seraf berjalan melewati lamina propia dan lapisan ini mengandung *gut associated lymphoid tissue* (GALT) yang penting dalam pertahanan melawan bakteri usus.



Gambar 1.Histologi Gaster

Mukosa muskularis adalah lapisan otot polos di sebelah luar yang terletak di sebelah lapisan submukosa.^[24]

Submukosa adalah lapisan tebal jaringan ikat yang menyebabkan saluran pencernaan memiliki elastisitas dan distensibilitas. Lapisan ini memiliki pembuluh darah dan limfe yang besar, keduanya bercabang – cabang ke arah luar ke lapisan otot sekitarnya.^[24]

Pengertian dari atrofi kelenjar, metaplasia intestinal dan kerusakan epitel permukaan lambung yaitu: atrofi mukosa gaster ialah hilangnya jaringan kelenjar, sehingga menyebabkan tipisnya mukosa dan menyebabkan kerusakan keras mukosa. Hilangnya jaringan kelenjar ini dapat karena proses inflamasi yang lama dan digantikan oleh fibrosis. Pergantian epitel antrum dengan epitel intestinal disebut metaplasia intestinal yang menimbulkan kesan adanya atrofi kelenjar secara mikroskopik, walaupun metaplasia sebenarnya adalah proses yang berdiri sendiri. Atrofi mukosa oxyntic berhubungan dengan hilangnya sekresi asam lambung dan terjadi metaplasia intestinal. Atrofi keras mukosa antrum biasanya dihubungkan dengan metaplasia intestinal dan meninggikan resiko terjadinya keganasan. Atrofi dapat juga ditemukan tanpa adanya metaplasia intestinal terutama pada gastritis autoimun.^[25]

2.3.3 Faktor – faktor yang mempengaruhi kerusakan gaster

2.3.3.1 Konsumsi obat yang berlebihan

Banyak sekali factor yang bisa menyebabkan kerusakan gaster, pada beberapa kasus penyebabnya adalah pemakaian obat. Pada penderita yang sering menggunakan aspirin, sering kali mengalami perubahan mukosa gaster dan perdarahan. Efek iritasi obat terhadap mukosa gaster pada tiap individu berlainan, tergantung dosis pemakaian.

Obat – obat lain yang mempunyai pengaruh terhadap mukosa gaster yaitu digitalis, yodium, antibiotic spectrum luas dan lain – lain. Pathogenesis yang dihasilkan berupa radang akibat iritasi mukosa. Kortikosteroid dosis tinggi dan penggunaan berulang juga meningkatkan pembentukan ulkus ^[26,27]

2.3.3.2 Infeksi

Sejak penemuan kuman *Helicobacter pylori* oleh Marshall dan Warren pada tahun 1983, kemudian terbukti bahwa infeksi *Helicobacter pylori* merupakan masalah global, termasuk di Indonesia, sampai saat ini belum jelas betul proses penularan serta patomekanisme infeksi kuman ini pada berbagai keadaan patologis saluran cerna bagian atas (SCBA). Pada tukak peptic infeksi *Helicobacter pylori* merupakan factor etiologi yang utama sedangkan untuk kanker lambung termasuk karsinogen tipe 1 yang definitive

Infeksi *Helicobacter pylori* pada saluran cerna bagian atas mempunyai variasi klinis yang luas, mulai dari kelompok asimtomatik sampai tukak peptic, bahkan dihubungkan dengan keganasan di lambung seperti adenokarsinoma tipe intestinal atau mucosal associated lymphoid tissue (MALT) Limfoma. ^[28]

2.3.3.3 Usia

Usia merupakan variabel yang paling berkaitan dengan prevalensi infeksi *Helicobacter pylori*. Semakin tua seseorang maka semakin besar kemungkinan terinfeksi *Helicobacter pylori*, karena pada orang tua terjadi penipisan lapisan lambung dan produksi mucus yang berkurang seiring dengan bertambahnya umur ^[29]

2.3.3.4 Diet

Sebuah studi kohort di Harvard School of Public Health menemukan bahwa diet tinggi serat berhubungan dengan pengurangan resiko dalam pengembangan ulkus peptikum. dalam waktu lebih dari 6 tahun, terjadi penurunan resiko sebesar 45% ulkus peptikum pada orang dengan konsumsi tinggi serat dibandingkan dengan orang yang tidak. Namun konsumsi tinggi serat yang tidak mempunyai efek terhadap kecepatan penyembuhan ulkus. ^[30]

2.4 Sistem Skoring Barthel Manja

Sistem scoring Barthel Manja adalah sistem scoring yang digunakan untuk mengukur tingkat kerusakan gaster pada penelitian dengan menggunakan dosis bertingkat. Tingkat kerusakan yang dimaksudkan adalah mengamati gambaran histopatologis gaster yang dipulas dengan Hematoksilin Eosin lalu diamati di bawah mikroskop dan diperiksa integritas mukosanya ^[32]

Tingkat kerusakan yang akan diamati yaitu:

1. Normal, yaitu tidak terdapat perubahan pada patologis
2. Deskuamasi permukaan epitel
3. Erosi permukaan epitel
4. Ulserasi permukaan epitel